

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 12 月 5 日 (05.12.2002)

PCT

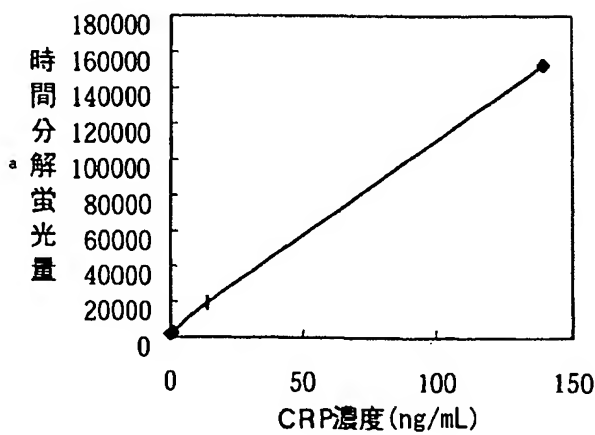
(10) 国際公開番号
WO 02/097436 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/533, 33/545 (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 片岡 一則
(KATAOKA, Kazunori) [JP/JP]; 〒165-0031 東京都
(21) 国際出願番号: PCT/JP02/05271 中野区 上鷺宮 5-17-22 Tokyo (JP). 長崎 幸夫
(NAGASAKI, Yukio) [JP/JP]; 〒302-0128 茨城県 守
(22) 国際出願日: 2002 年 5 月 30 日 (30.05.2002) 谷市 けやき台 3-5-17 Ibaraki (JP). 柴田 直哉
(SHIBATA, Naoya) [JP/JP]; 〒271-0051 千葉県 松戸市
(25) 国際出願の言語: 日本語 馬橋 1405-1 イーストコート 202 Chiba (JP).
(26) 国際公開の言語: 日本語 星野 信広 (HOSHINO, Nobuhiro) [JP/JP]; 〒101-0031
東京都 千代田区 東神田 1 丁目 1 番 4 号 株式会社
(30) 優先権データ: ヤトロン内 Tokyo (JP).
特願2001-161787 2001 年 5 月 30 日 (30.05.2001) JP (74) 代理人: 森田 憲一 (MORITA, Kenichi); 〒173-0004 東
京都 板橋区 板橋二丁目 6 7 番 8 号 板橋中央ビル 5 階
Tokyo (JP).
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
ヤトロン (IATRON LABORATORIES, INC.) [JP/JP];
〒101-0031 東京都 千代田区 東神田 1 丁目 1 番 4 号
Tokyo (JP). ナノキャリア株式会社 (NANOCARRIER
CO., LTD.) [JP/JP]; 〒277-0882 千葉県 柏市 柏の葉 5 丁
目 4 番地 6 Chiba (JP). (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,

[続葉有]

(54) Title: CORE-SHELL TYPE PARTICLES HAVING SIGNAL-GENERATING SUBSTANCE ENCLOSED THEREIN AND
PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子及びその製造方法

a...TIME-RESOLVED FLUORESCENCE
b...CRP CONCENTRATION (ng/mL)

(57) Abstract: Core-shell type particles having a signal-generating substance enclosed therein which substantially consist of (1) a core part substantially made of a water-insoluble polymer compound and (2) a shell part substantially made of a water-soluble polymer compound having a reactive functional group and covering the core surface like a brush and in which the core part and the shell part constitute, as a whole, a block copolymer of the water-insoluble polymer and the water-soluble polymer, characterized in that the signal-generating substance is enclosed in the core part. The above-described core-shell type particles having a signal-generating substance enclosed therein are useful as labels which contain neither radioisotopes restricted in handling nor enzymes having troubles in stability, are inferior in sensitivity to fluorescent substances and never undergo nonspecific adsorption.

[続葉有]



WO 02/097436 A1



LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO,
NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特
許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

(1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、前記コア部分にシグナル生成物質が封入されていることを特徴とする、シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子、及びその製造方法を開示する。

前記シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子は、扱いに制限を受ける放射性物質、安定性に問題がある酵素を用いず、蛍光物質より高感度で、非特異的吸着を起こさない標識物質として有用である。

明 細 書

シグナル生成物質封入コアシェル型粒子及びその製造方法

技術分野

本発明は、シグナル生成物質封入コアシェル型粒子及びその製造方法に関する。本発明のシグナル生成物質封入コアシェル型粒子は、表層に反応性官能基を有する水溶性高分子化合物〔例えば、ポリエチレングリコール（PEG）〕をブラシ状に担持する粒子の内部に、検出可能な物質を封入して含んでおり、最外殻に他の物質と結合性を有する活性残基を有しているので、簡易且つ高感度な標識物質として使用することができる。

背景技術

微量な物質を視覚化したり、あるいは、定量するために、種々の標識物が開発されてきた。特に高感度を必要とする分野では、ラジオアイソトープが代表的な標識物であり、トリチウムや放射性ヨウ素等が代表例として用いられ、フィルムによる感光、あるいは、シンチレーションカウンタによる放射能の測定という形で検出されてきた。

続いて、放射性物質の取り扱い制限に影響されない方法として、酵素標識法が開発された。ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、又は β -D-ガラクトシダーゼ等の抗原又は抗体に対する標識法が開発され、組織切片の染色法による観察や、酵素免疫測定法に適用した定量法が確立された。

一方、組織切片の染色法として、蛍光物質（例えば、フルオレッセイン又はローダミン等）を抗体に標識し、反応後、蛍光顕微鏡で観察するという方法が知られている。この方法は、放射性物質を用いることがないため、使用に制限を受けない点や、酵素のように基質を加えて反応するステップの必要がない点等、便利な点が多いが、標識としての絶対的感度が不足するという欠点がある。

この蛍光物質標識法の一つの発展型に時間分解蛍光測定がある。ユーロピウムキレートに代表される蛍光消光時間の長い蛍光物質にパルスの励起光をあて、直

接の励起光や周辺物質に起因する短い蛍光が消光してしまう一定時間の後に、蛍光を測定し、ユーロピウム特異的蛍光を測定することにより、測定の精度及び感度を上昇させようという方法である。

更に感度を上げるために、このユーロピウムキレートをポリスチレン粒子に閉じこめ、一粒子あたりの蛍光物質を増やして、感度を上昇させる試みもなされてきた。この方法では確かに粒子あたりの蛍光量は増すが、ポリスチレンは疎水性であるため、粒子表面も疎水性となり、生物学的反応に用いるには、環境に存在する多くの疎水性物質とべたべたくっつくという不利な点を承知の上で使用しなければいけないという欠点をもっていた。

一方、感度の向上よりも、むしろ操作の手軽さを追求する手段として色素をポリスチレン粒子に閉じこめ、ポリスチレン粒子の表面に抗原又は抗体をコートして試薬とし、抗原抗体反応によって固定化されたポリスチレン粒子を視覚的に検出しようとする試みもなされている。

公知技術として知られている、色素や蛍光物質をポリスチレン粒子に閉じこめて標識物質とする方法は、操作の手軽さ、あるいは、或る程度の感度が得られるという意味で優れたものであるが、表面が疎水性ポリスチレンであるという特質から、（１）コートしたい抗原又は抗体等の機能性分子を結合した後、非結合表面にタンパク質や種々の生体物質の類似物質をコートしてポリスチレンの疎水性を覆い隠す方法、あるいは、（２）反応時に液体中に界面活性剤を加えてポリスチレン粒子が相互に影響し合うのを防ぐ方法等の工夫をして用いてきたが、それでも非特異的な反応による判定の誤りが生まれることがあった。

このように、ポリスチレン粒子を担体として用い、その粒子をブロッキング剤で安定化させる方法、あるいは、反応時の緩衝液に添加剤を加えて非特異的反応を抑制する方法などの対応では、感度と特異性の点で問題がある。

発明の開示

本発明の課題は、標識物質として使用することのできるシグナル生成物質封入粒子であって、例えば、環境物質や生体成分などとの非特異的反応の影響を受けずに、しかも、高感度で、且つ簡便に調製することのできる前記シグナル生成物質封入粒子及びその製造方法を提供することにある。

前記課題は、本発明による、

(1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、

前記コア部分にシグナル生成物質が封入されていることを特徴とする、シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子により解決することができる。

また、本発明は、

(a) (1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子と、(b) シグナル生成物質とを、前記水不溶性高分子化合物を膨潤させることのできる有機溶媒を含有する溶液中に浸漬することによって、コア部分に前記シグナル生成物質を封入させることを特徴とする、前記シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子の調製方法に関する。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1(1)で調製したブロックコポリマーの¹H-NMRスペクトルである。

図2は、実施例1(2)で得られたアルデヒド末端PEG被覆粒子の走査電子顕微鏡(SEM)写真である。

図3は、実施例1(2)で得られた比較用アルデヒド末端PEG被覆粒子のSEM写真である。

図4は、ユーロピウムキレート封入粒子を用いたイムノアッセイ法によるCRP測定の結果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 水不溶性高分子化合物を主成分とするコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物を主成分とし、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなるコア-シェル型粒子、すなわち、水不溶性高分子化合物を主成分とするコア部分の表面に、表層に反応性官能基を有する水溶性高分子化合物ブラシを有するコア-シェル型粒子それ自体は、公知である。

本発明において、コア部分を形成するのに用いることのできる水不溶性高分子化合物は、水に溶解しない高分子化合物であって、しかも、コア部分を形成した際に、その内部にシグナル生成物質を封入することができる高分子化合物である限り、特に限定されるものではない。前記水不溶性高分子化合物としては、例えば、疎水性ポリマー〔例えば、ポリスチレン、ポリメタクリル酸メチル、ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) ポリイソプレン、ポリ塩化ビニル、ポリ乳酸、ポリラクトン、又はポリラクタムなど〕、水溶性ポリマー(例えば、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリアリルアミン、又はポリアクリル酸など)の架橋ゲル、あるいは、水不溶性天然高分子化合物(例えば、ゼラチン又は多糖など)などを挙げることができる。

本発明において、前記のコア部分は、前記の水不溶性高分子化合物1種類のみから実質的に形成されているか、又は前記の水不溶性高分子化合物2種類以上の組み合わせから実質的に形成されていることができる。

前記コア部分の形状は特に限定されるものではないが、一般的には大略球状あるいは大略楕球状である。また、前記コア部分の寸法も特に限定されるものではなく、用途に応じて適宜変化させることができるが、大略球状のコア部分の直径は、一般的には5 nm~500 nm程度である。

本発明において、シェル部分を形成するのに用いることのできる水溶性高分子化合物は、直鎖状の高分子化合物であり、その一方の末端(結合末端)でコア部分の表面と結合できると共に、もう一方の末端(自由末端)に反応性官能基を有するか、あるいは、反応性官能基を導入することができ、しかも、前記コア部分の表面にブラシ状に配置することが可能である限り、特に限定されるものではない。本明細書において、「コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部」とは、シェル部が多数の直鎖状水溶性高分子化合物からなり、それら直鎖状

水溶性高分子化合物の各々が一方の結合末端でコア部分の表面と結合し、しかも、もう一方の自由末端が、少なくとも水溶性高分子化合物と導入物（例えば、抗原又は抗体）とを反応させる反応液中において、その反応液の系中に糸状又は棒状に表面から突出していることを意味する。また、これらのブラシ状の水溶性高分子化合物鎖の自由末端には、それぞれ導入物〔例えば、生理活性物質（例えば、抗体、酵素、又はDNA）〕と結合可能な反応性官能基が存在するので、シェル部分の最外殻は、多数の反応性官能基で覆われている。

前記水溶性高分子化合物としては、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアミノ酸、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル、又はポリアリルアミンなどを挙げることができ、PEG又はポリビニルアルコールが好ましい。

本発明において、シェル部を構成する水溶性高分子化合物鎖は、各水溶性高分子化合物鎖が前記の水溶性高分子化合物1種類のみから実質的に形成されているか、又は各水溶性高分子化合物鎖が相互に異なる前記の水不溶性高分子化合物2種類以上の組み合わせから実質的に形成されていることができる。

前記シェル部分を構成する水溶性高分子化合物鎖は、前記のコア部分の全表面を実質的に完全に覆っているのが好ましい。また、前記シェル部分を構成する各水溶性高分子化合物鎖は、それぞれ、実質的に同じ長さであり、各水溶性高分子化合物鎖の自由末端によって大略球状又は大略楕球状のシェル部分外殻表面が形成されるのが好ましい。

前記コア部分の直径と前記シェル部分の厚さとの比率は、用途に応じて適宜変化させることができる。例えば、コア部分の直径を、例えば、5 nm～500 nmとすることができ、また、シェル部分の厚さを、例えば、5 nm～500 nmとすることができる。

前記水溶性高分子化合物鎖の自由末端に存在する反応性官能基は、前記水溶性高分子化合物の一方の末端（結合末端）をコア部分表面に結合させる前からもう一方の末端（自由末端）に存在するか、あるいは、前記水溶性高分子化合物の一方の末端（結合末端）をコア部分表面に結合させた後からもう一方の末端（自由末端）に導入することができる。これらの反応性官能基は、いずれも水（又は水系溶媒）中で安定であり、しかも、本発明のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒

子を標識物質として使用する際の導入物〔例えば、生理活性物質（例えば、抗体、酵素、又はDNA）〕と反応可能な官能基である限り、特に限定されるものではなく、例えば、アルデヒド基、カルボキシル基、メルカプト基、アミノ基、マレイミド基、ビニルスルホン基、又はメタンスルホニル基などを挙げることができ、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシル基、又はマレイミド基が好ましい。

水不溶性高分子化合物を主成分とするコア部分の表面に、表層に反応性官能基を有する水溶性高分子化合物ブラシを有するコアシェル型粒子を調製する方法としては、これまで報告されている様々な公知方法が適用可能である。前記公知方法としては、例えば、

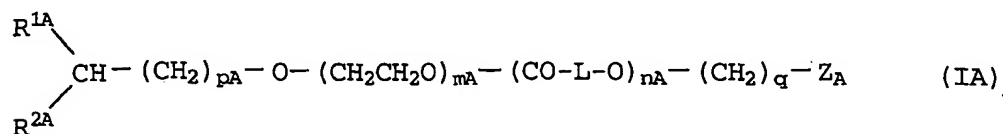
(1) (a) 反応性官能基を有する親水性セグメントと疎水性セグメントとを結合したブロック共重合体（親-疎水型ブロック共重合体）と、(b) 疎水性ポリマーとを混合して粒子を調製するエマルジョン法；

(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子マクロモノマーを分散剤として、疎水性モノマーを重合させる分散重合法；又は

(3) ハイドロゲル粒子表面に水溶性高分子化合物ブラシを導入する方法などを挙げることができる。

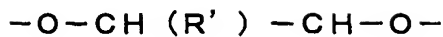
前記のエマルジョン法(1)で用いる親-疎水型ブロック共重合体の合成方法、及び前記の分散重合法(2)で用いる反応官能基を有する水溶性高分子マクロモノマーの合成方法としては、例えば、既に本発明者及びその共同研究者が開発した方法（例えば、WO 96/33233号公報、WO 99/57174号公報、又は特開平11-322917号公報）を用いることができる。

前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、WO 96/33233号公報に記載の式(IA)：



〔式中、 R^{1A} 及び R^{2A} は、独立して、炭素数1～10のアルコキシ基、アリールオキシ基、又はアリール（炭素数1～3のアルキルオキシ）基であるか、あるいは、 R^{1A} 及び R^{2A} は、一緒になって、炭素数1～6のアルキル基で置換されて

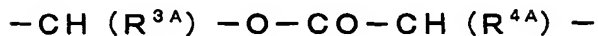
いてもよい式：



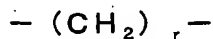
(ここでR' は水素原子又は炭素数1～6のアルキル基である)

で表されるエチレンジオキシであるか、あるいは、R^{1A}及びR^{2A}は、一緒になって、オキシ(=O)であり、

Lは、式：



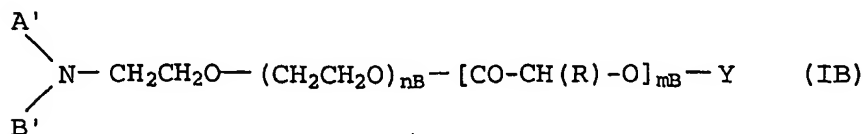
又は



で表される2価の基であり、ここで、R^{3A}及びR^{4A}は、独立して、水素原子、炭素数1～10のアルキル基、アリール基、又はアリールー(炭素数1～3のアルキルオキシ)基であり、rは2～5の整数であり、m_Aは2～10,000の整数であり、n_Aは2～10,000の整数であり、p_Aは1～5の整数であり、qは0又は1～20の整数であり、そして、Z_Aは、qが0であるとき、水素原子、アルカリ金属、アセチル基、アクリロイル基、メタクリロイル基、シンナモイル基、p-トルエンシルホニル基、2-メルカプトプロピオニル基、2-アミノプロピオニル基、アリル基、又はビニルベンジル基であり、qが1～20の整数であるとき、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、カルボキシルメルカプト基、又はアミノ基である]

で表されるヘトロテレケリックブロックコポリマーを挙げることができる。前記の式(I A)で表されるヘトロテレケリックブロックコポリマーは、例えば、WO 96/33233号公報に記載の製造方法により調製することができる。

また、前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、WO 99/571743号公報に記載の式(I B)：



(式中、A' 及びB' は、相互に独立して、有機シリル型のアミノ保護基を表すか、あるいは、それらが結合する窒素原子と一緒にあって、4～7員のジシラー

アザシクロヘテロ環式環を形成することのできる有機シリル型のアミノ保護基であり、

Yは、水素原子、アルカリ金属、又は適当な反応によりアルカリ金属に代えて導入可能な有機基であり、

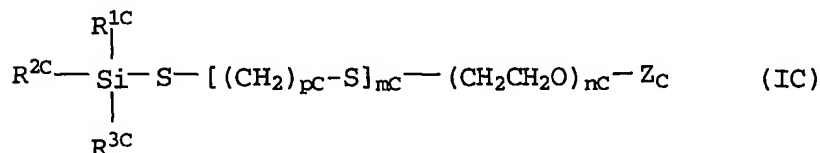
Rは水素原子又は炭素数1～6のアルキル基であり、

n_B は1～20, 000の整数であり、そして、

m_B は0～20, 000の整数である)

で表されるポリオキシエチレン誘導体を挙げることができる。前記の式(1B)で表されるポリオキシエチレン誘導体は、例えば、WO99/571743号公報に記載の製造方法により調製することができる。

更に、前記の親-疎水型ブロック共重合体又は水溶性高分子マクロモノマーとして使用することのできる化合物としては、例えば、特開平11-322917号公報に記載の式(1C)：



(式中、 R^{1C} 、 R^{2C} 、及び R^{3C} は、相互に独立して、直鎖若しくは分岐のアルキル基又はアラルキル基を表し、

Z_C は、水素原子、アクリロイル基、メタクリロイル基、ビニルベンジル基、アリル基、パラトルエンスルホニル基、モノー若しくはジ-低級アルキル置換アミノ基、カルボキシル基若しくはそのエステル基を有するアルキル基、アルデヒド基若しくはそのアセタール基を有するアルキル基、及びアルカリ金属からなる群より選ばれ、

m_C は0又は1であり、

n_C は0～20, 000の整数であり、そして、

p_C は正数2又は3であるが、

但し、 m_C と n_C は同時に0とならない)

で表される有機シリルスルフィド基含有化合物又はポリオキシエチレン誘導体を挙げることができる。前記の式(1C)で表される有機シリルスルフィド基含有

化合物又はポリオキシエチレン誘導体は、例えば、特開平 1 1 - 3 2 2 9 1 7 号公報に記載の製造方法により調製することができる。

コア-シェル型粒子の前記エマルジョン法 (1) によれば、前記の式 (I A)、式 (I B)、又は式 (I C) で表される各化合物 (すなわち、親-疎水型ブロック共重合体) と、疎水性ポリマーとを混合することにより、コア-シェル型粒子 (すなわち、シグナル生成物質を封入する前の粒子) を調製することができる。

また、コア-シェル型粒子の前記分散重合法 (2) によれば、前記の式 (I A)、式 (I B)、又は式 (I C) で表される各化合物 (すなわち、水溶性高分子マクロモノマー) を分散剤として、疎水性モノマーを重合させることにより、コア-シェル型粒子 (すなわち、シグナル生成物質を封入する前の粒子) を調製することができる。

本発明において使用することのできるシグナル生成物質は、コア-シェル型粒子のコア部分に封入した状態でも、そのシグナルをコア-シェル型粒子の外側から分析 (検出及び測定を含む) することのできる物質である限り、特に限定されるものではなく、例えば、蛍光物質、発光物質、又は色素を挙げることができる。

前記蛍光物質としては、例えば、ランタノイドキレート (例えば、ランタンキレート、セリウムキレート、プラセオジムキレート、ネオジムキレート、プロメチウムキレート、サマリウムキレート、ユウロピウムキレート、ガドリニウムキレート、テルビウムキレート、ジスプロシウムキレート、ホルミウムキレート、エルビウムキレート、ツリウムキレート、イッテルビウムキレート、又はルテチウムキレート、好ましくはユウロピウムキレート又はテルビウムキレート)、フルオロセインイソシアネート、ジクロロトリアジニルフルオロセイン、又はテトラメチルローダミンイソシアネートを挙げることができる。

また、前記色素としては、例えば、メチルイエロー、ソルベントブルー 35、オイルオレンジ SS、又はオイルレッド EGN を挙げることができる。

シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子の直径も、用途に応じて適宜変化させることができるが、大略球状の粒子の場合、10 nm ~ 1 mm 程度であることができる。

本発明のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子は、例えば、本発明の製造方法により調製することができる。

本発明による製造方法では、例えば、先に説明した種々の公知方法により調製したコアシェル型粒子（すなわち、シグナル生成物質を封入する前の粒子）に、シグナル生成物質を封入するのに、まず、コアシェル型粒子のコア部分を形成する水不溶性高分子化合物を膨潤させる有機溶媒（例えば、アセトン又はトルエン等）が一定比率で含まれる溶液中に、前記コアシェル型粒子及びシグナル生成物質（例えば、疎水的な性質を有する色素又は蛍光物質など）を浸漬させる。前記浸漬により、前記水不溶性高分子化合物は膨潤し、その膨潤に伴ってシグナル生成物質がコア部分に取り込まれる。続いて、この混合物から、有機溶媒を除去すると、前記水不溶性高分子化合物は収縮するが、疎水的なシグナル生成物質はコア部分から外に出ることができず、コア部分に封入される。所望により、コア部分に取り込まれなかったシグナル生成物質を除去することにより、本発明のシグナル生成物質封入コアシェル型粒子を得ることができる。

本発明による製造方法において、前記混合物から有機溶媒を除去する方法としては、特に限定されるものではないが、例えば、エバポレートなどにより有機溶媒を蒸発乾固する方法、あるいは、非溶媒中で収縮させる方法（例えば、有機溶媒を含有する溶液を、前記有機溶媒を含有しない溶液に置換する方法）などを挙げることができる。

また、コア部分を膨潤するのに用いる前記有機溶媒含有溶液における有機溶媒の割合は、シグナル生成物質が水不溶性高分子化合物に取り込まれる程度まで、前記水不溶性高分子化合物を膨潤させることができる割合である限り、特に限定されるものではないが、例えば、40～60（vol/vol）%であることができる。

本発明においては、本発明のシグナル生成物質封入コアシェル型粒子の表面に存在する反応性官能基に、更に、前記反応性官能基と反応可能な導入物（例えば、生理活性物質）を結合させることができる。

前記導入物は、シグナル生成物質封入コアシェル型粒子の表面に存在する反応性官能基と反応可能である限り、特に限定されるものではないが、生理活性物質、例えば、タンパク質（例えば、抗体又は酵素）若しくは核酸（例えば、DNA又はRNA）、又は細胞などを挙げることができる。

導入物と、シグナル生成物質封入コアシェル型粒子の表面に存在する反応性

官能基とを結合させる方法は、公知の結合方法の中から、前記導入物及び反応性官能基の種類に応じて適宜選択することができる。

例えば、反応性官能基がアルデヒド基である場合には、生理活性物質〔例えば、タンパク質（例えば、抗原、抗体、又はレセプター等）、ペプチド、低分子ホルモン、又はDNA等〕のアミノ基と Schiff ベースを形成させることにより、結合することができる。

また、反応性官能基がカルボキシル基である場合には、生理活性物質のアミノ基との間を、縮合剤（例えば、カルボジイミドなど）を用いて結合することができる。あるいは、予めカルボキシ基をスクシンイミド又はマレイミド等で活性化しておいて、その状態のまま、生理活性物質と混合することにより結合させることもできる。

実施例

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

(1) アセタール-PEG-PLA-メタクリロイルの合成

アルゴン下、室温の反応容器に、溶媒としてテトラヒドロフラン（THF）40 mL を装入した後、3, 3'-ジエトキシ-1-プロパノール 0.32 mL（2 mmol）を加え、更に、0.3263 mol/L カリウムナフタレンの THF 溶液 6.2 mL（2 mmol）を加え、15 分間攪拌し、メタル化を行なった。更に、冷却したシリンジにてエチレンオキシド 12 mL（240 mmol）を加えた後、室温で 2 日間攪拌し、開環重合を行なった。次に、1 mol/L の DL-ラクチド THF 溶液 84 mL（84 mmol）を加え、室温で 3 時間重合した。その後、無水メタクリル酸 4.5 mL（28 mmol）を加え、室温にて 2 日間攪拌してから、停止反応を行なった。

得られたブロックコポリマー溶液を、 -15°C に冷却した 2-プロパノールに再沈殿させた後、遠心分離（6000 rpm, 40 分間, -10°C ）を行ない、溶媒を除去した。この操作を 2 回繰り返してブロックコポリマーの精製を行なった後、ベンゼンに溶解し、凍結乾燥を行なった。

図1に、ブロックコポリマーの ^1H -NMRスペクトルを示す。ポリエチレングリコール（PEG）の分子量は、GPC測定の結果より算出した。ポリ乳酸（PLA）の分子量は、 ^1H -NMRの結果より、GPC測定で得られたPEG分子量を用いて算出した。PEGの分子量は約5000であり、PLAの分子量は約500であった。

（2）アルデヒド末端PEG被覆粒子の調製

アルゴン下、室温の反応容器に、アルゴン置換した超純水160mLを加えた後、アゾビスイソブチロニトリル（AIBN）30mg及びブロックコポリマー【実施例1（1）で調製したもの】3.4gのスチレン溶液2mLをアルゴン置換し、攪拌下（400rpm）で滴下した。

室温にて30分間攪拌した後、60℃にて18時間、更に80℃にて6時間攪拌（400rpm）することにより、重合を行なった。重合反応終了後、濾紙【Filter paper 2（直径=185mm）；Advantec社】による濾過を行なうことにより樹脂塊やゴミ等を分別し、表層部にアセタール基を有するパーティクル（acetal functionalized particle）を得た。このパーティクルを水中に分散させた後、1mol/L-HClを用いて、前記パーティクル分散液をpH2.0に調整した後、2時間攪拌した。その後、1mol/L-NaOHを用いてpH5.0として、保護基であるアセタール基を脱保護し、表層部にアルデヒド基を導入した。

その後、脱塩のため、このパーティクル分散液100mLを蒸留水2Lに対して一日透析【分画分子量（MWCO）=12000~14000、蒸留水を4回交換】を行なった後、濾紙【Filter paper 2（直径=185mm）；Advantec社】による濾過を行ない、表層部にアルデヒド基を有するパーティクル（aldehyde functionalized particle）、すなわち、末端アルデヒドブロックポリマースチレン粒子（粒径=65nm）を得た。得られた粒子（PEG分子量=約5000、PLA分子量=約500）の走査電子顕微鏡（SEM）写真を、図2に示す。

また、実施例1（1）において、エチレンオキシドの開環重合を行なった後、DL-ラクチドTHF溶液を加えることなく、無水メタクリル酸を加えたこと以外は、実施例1（1）及び実施例1（2）の操作を繰り返すことにより、PLA

ユニットの長さを変化させた比較用粒子（PEG分子量＝約5000，PLA分子量＝0）を調製した。得られた比較用粒子のSEM写真を、図3に示す。

（3）ユーロピウムキレート封入粒子の調製

塩化ユーロピウム6水和物の水溶液（22mg/mL、蒸留水）1mLに、チエノイルトリフルオロアセトン（TTA）のアセトン溶液（37mg/mL）1mLを加え、更にトリオクチルホスフィンオキサイド（TOPO）のアセトン溶液（43.5mg/mL）2mLを加えて、ユーロピウムキレート溶液を調製した。

一方、実施例1（2）で調製した末端アルデヒドブロックポリマースチレン粒子（粒径＝65nm）の懸濁液（18mg/mL、蒸留水）5mLに、アセトン5mLを加え、攪拌した。この混合液に、先に調製したユーロピウムキレート溶液0.12mLを加え、更に10秒間攪拌した。攪拌終了後、遮光下で室温にて30分間静置した後、窒素ガスを吹き付けてアセトンを除去した。その後、粒子に取り込まれず、アセトンを除去したために沈殿したユーロピウムキレートを、0.2ミクロンのフィルターを通すことで除くことにより、本発明のユーロピウムキレート封入粒子を得た。

実施例2

（1）ユーロピウム封入粒子標識抗CRP抗体の調製

実施例1で調製したユーロピウム封入粒子0.5mLに、0.2mol/Lリン酸緩衝液（pH8.0）0.5mLを加えて攪拌した後、抗C反応性タンパク質（CRP）ウサギ抗体F（ab'）₂分画（20mg/mL、生理食塩水）0.1mLを加えて混和し、室温で一時間静置反応を実施した。なお、前記抗CRPウサギ抗体F（ab'）₂分画は、常法に従って、抗CRPウサギ抗体（Dako社）から調製した。この反応液に、NaBCNH₃ 12mgを加え、室温で15時間混和反応を実施した。

反応液を、0.15M塩化ナトリウム含有50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.8）で平衡化したセファクリルS-300カラム（1cm×45cm；ファルマシア）にアプライし、10mL/時間の流速で1mL/チューブに分画した。

最初に溶出された粒子のピークを紫外部の吸光度でモニターし、プールしてユーロピウム封入粒子標識抗CRP抗体とした。

(2) ユーロピウム封入粒子標識抗CRP抗体を用いたイムノアッセイ法によるCRPの測定

ELISA用96穴プレートの各ウェルに、生理食塩水で $4\mu\text{g/mL}$ に希釈した抗CRPウサギ抗体 $F(ab')_2$ 分画 $50\mu\text{L}$ を分注し、 4°C で一夜静置コートした。 $1/15\text{mol/L}$ リン酸緩衝液(PBS; $\text{pH}7.4$)で各ウェルを3回洗浄した後、1%牛血清アルブミン(BSA)含有PBS 0.25mL を各ウェルに分注して 37°C で一時間ブロックした。

$1/15\text{mol/L}$ -PBS($\text{pH}7.4$)で各ウェルを3回洗浄した後、0.1%トウイーン(Tween)20及び0.15M塩化ナトリウム含有50mMトリス塩酸緩衝液($\text{pH}7.5$)で希釈したCRP標準品 $50\mu\text{L}$ を各ウェルに分注し、 37°C で一時間静置反応を実施した。

$1/15\text{mol/L}$ -PBS($\text{pH}7.4$)で各ウェルを3回洗浄した後、実施例2(1)で調製したユーロピウム封入粒子標識CRP抗体の希釈液[0.1%トウイーン20、0.2%BSA、及び0.15M塩化ナトリウム含有50mMトリス塩酸緩衝液($\text{pH}7.5$)で1000倍に希釈したもの] $50\mu\text{L}$ を各ウェルに分注して、 37°C で一時間静置反応を実施した。

$1/15\text{mol/L}$ -PBS($\text{pH}7.4$)で各ウェルを5回洗浄した後、プレートの時間分解蛍光量を時間分解蛍光光度計(ワック社)で1秒間測定した。結果を表1と図4に示す。

表1

CRP抗原濃度 (ng/mL)	時間分解蛍光量
0	1611
0.14	1713
1.4	2566
14	19259
140	152695

産業上の利用可能性

本発明のシグナル生成物質封入粒子は、生理活性物質の標識物質として使用する

ることが可能であり、生理活性物質の活性を利用して結合反応を行わせた後、シグナル生成物質から発生されるシグナルから感度良く、特異的に測定対象物質を検出することが可能である。従って、このシグナル生成物質封入粒子は、安全且つ簡便な優れた標識物質として、広い分野に応用することができる。

今日、農薬や環境ホルモン等の低分子量物質、種々の生体が異常を起こしたときに体液に放出される抗原又は抗体、あるいは、生体内に侵入したウイルス由来の抗原、それに対抗する抗体、DNA、又はRNA等、高感度に測定することが有意義な物質は非常に多い。そのために、ラジオアイソトープ、酵素、蛍光物質、又は色素等を、測定対象物質に対し結合活性を有する物質に標識し、種々の操作法によって測定する方法が開発されてきた。しかし、本発明のシグナル生成物質封入粒子は、公知の標識物質に比べ、感度、操作の手軽さ、及び非特異的反応の少なさ等の面で優れた標識物質である。

以上、本発明を特定の態様に沿って説明したが、当業者に自明の変形や改良は本発明の範囲に含まれる。

請 求 の 範 囲

1. (1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子において、
前記コア部分にシグナル生成物質が封入されていることを特徴とする、シグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
2. 水溶性高分子化合物がポリエチレングリコールである、請求項 1 に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
3. 水不溶性高分子化合物がポリスチレンである、請求項 1 又は 2 に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
4. 反応性官能基が、アルデヒド基、アミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、又はスクシンイミド基である、請求項 1～3 のいずれか一項に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
5. シグナル生成物質が色素である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
6. シグナル生成物質が蛍光物質である、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
7. シグナル生成物質がランタノイドキレートである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子。
8. (a) (1) 水不溶性高分子化合物から実質的になるコア部分と、(2) 反応性官能基を有する水溶性高分子化合物から実質的になり、前記コア部分の表面をブラシ状に覆うシェル部分とからなり、しかも、前記コア部分と前記シェル部分とが、全体として、水不溶性高分子と水溶性高分子とのブロックコポリマーからなるコア-シェル型粒子と、(b) シグナル生成物質とを、前記水不溶性高分子化合物を膨潤させることのできる有機溶媒を含有する溶液中に浸漬することによって、コア部分に前記シグナル生成物質を封入させることを特徴とする、請求項 1 に記載のシグナル生成物質封入コア-シェル型粒子の調製方法。

1 / 2

FIG. 1

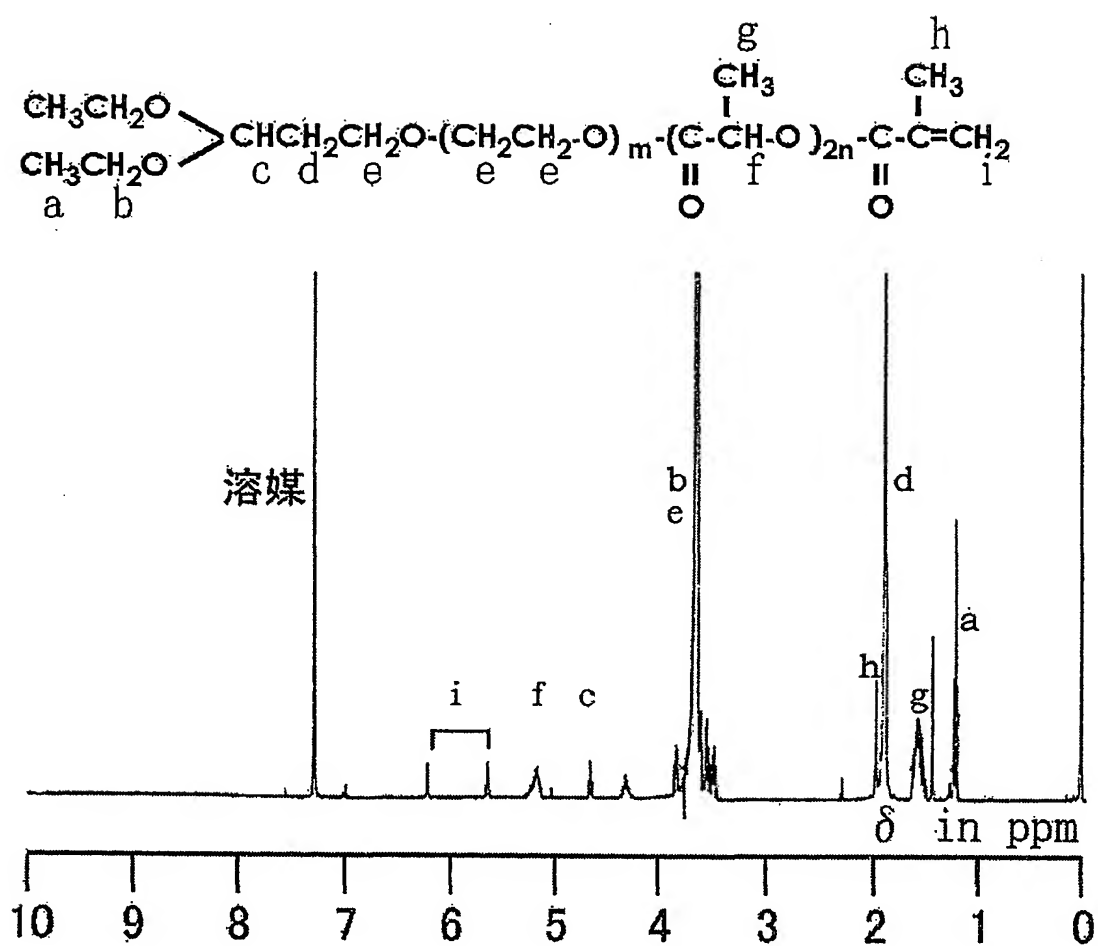


FIG. 2

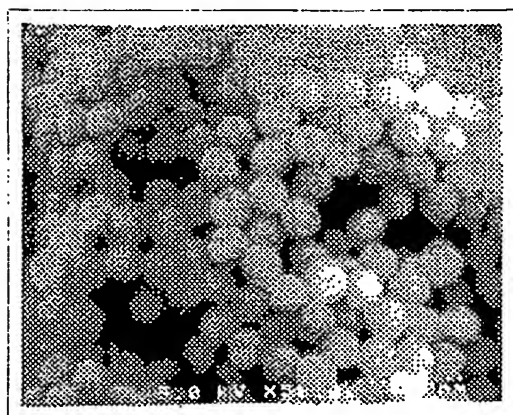
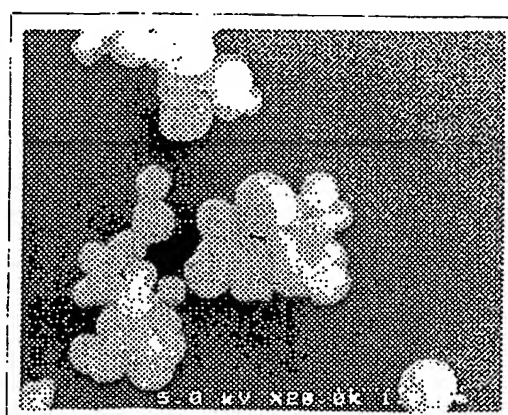
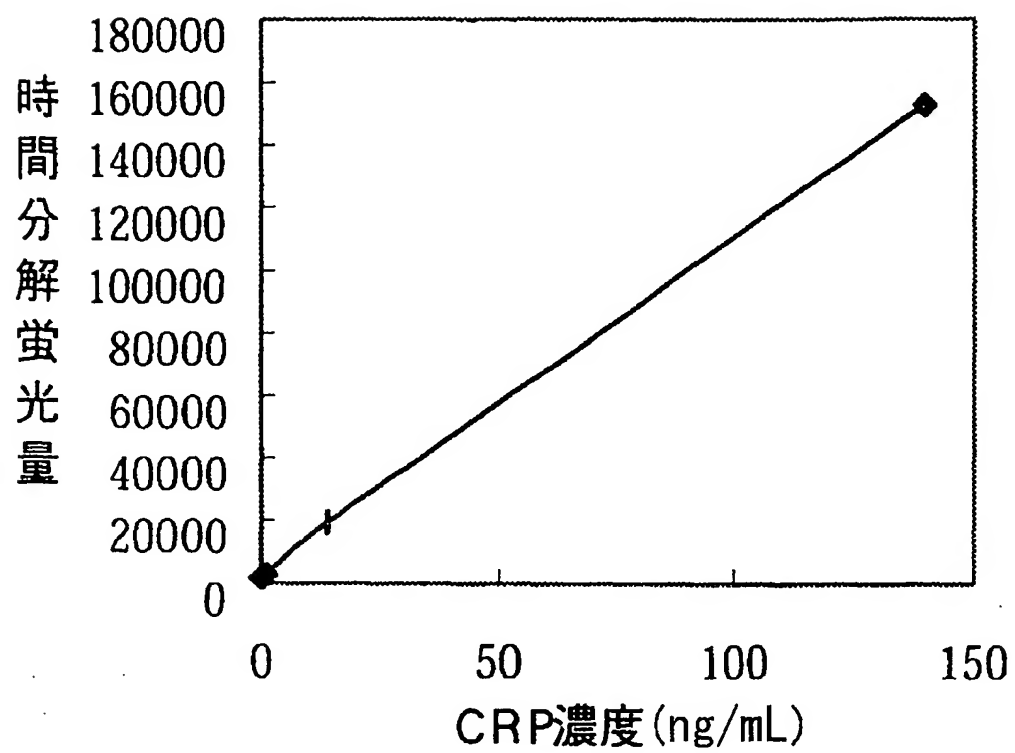


FIG. 3



2 / 2

FIG. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05271

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/533, 33/545

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/532-535, 33/543-556

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2002 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-66312 A (Kabushiki Kaisha Baiomeito), 16 March, 2001 (16.03.01), Claims; examples (Family: none)	1-8
Y	JP 10-195152 A (Kazunori KATAOKA), 28 July, 1998 (28.07.98), Claims (Family: none)	1-8
Y	JP 2000-500798 A (Abion Beteiligungs), 25 January, 2000 (25.01.00), Claims; page 11; examples & WO 97/19354 A & CN 1207810 A	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to
"A" document defining the general state of the art which is not	understand the principle or theory underlying the invention
considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
"E" earlier document but published on or after the international filing	considered novel or cannot be considered to involve an inventive
date	step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
cited to establish the publication date of another citation or other	considered to involve an inventive step when the document is
special reason (as specified)	combined with one or more other such documents, such
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other	combination being obvious to a person skilled in the art
means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later	
than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 26 June, 2002 (26.06.02)	Date of mailing of the international search report 09 July, 2002 (09.07.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/05271

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 5-262809 A (Konica Corp.), 12 October, 1993 (12.10.93), Claims (Family: none)	1-8
P,X	JP 2001-208754 A (Kazunori KATAOKA), 03 August, 2001 (03.08.01), Claims; Par. No. [0009]; examples & WO 01/55722 A & AU 2709401 A	1-8
P,Y	JP 2002-80903 A (Japan Science and Technology Corp.), 22 March, 2002 (22.03.02), & WO 02/20200 A	1-8
P,Y	JP 2001-324507 A (Nano Carrier Co., Ltd.), 22 November, 2001 (22.11.01), & WO 01/88541 A	1-8

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/533、33/545

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/532-535、33/543-556

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2002年
 日本国登録実用新案公報 1994-2002年
 日本国実用新案登録公報 1996-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-66312 A, (株式会社バイオメイト) 2001.03.16, 特許請求の範囲、実施例 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 10-195152 A, (片岡一則) 1998.07.28, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8
Y	JP 2000-500798 A, (アヴィオン ベタイリグンクス) 2000.01.25 特許請求の範囲、第11頁、実施例 & WO 97/19354 A & CN 1207810 A	1-8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.06.02

国際調査報告の発送日

09.07.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵

2 J

9408

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 5-262809 A, (コニカ株式会社) 1993. 10. 12 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-8
PX	JP 2001-208754 A, (片岡一則) 2001. 08. 03 特許請求の範囲、 【0009】、実施例 & WO 01/55722 A & AU 2709401 A	1-8
PY	JP 2002-80903 A, (科学技術振興事業団) 2002. 03. 22 & WO 02/20200 A	1-8
PY	JP 2001-324507 A, (ナノキャリア株式会社) 2001. 11. 22 & WO 01/88541 A	1-8